



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 35/78		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/66134
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	9. November 2000 (09.11.00)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03869</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 28. April 2000 (28.04.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 19 585.4 29. April 1999 (29.04.99) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): CMI-CENTERS FOR MEDICAL INNOVATION AG [DE/DE]; Fraunhofer Strasse 15, D-82152 Martinsried/München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WAGNER, Hildebert [DE/DE]; Nelkenstrasse 9, D-83254 Breitbrunn (DE). VOLLMAR, Angelika [DE/DE]; Waldhüterstrasse 56, D-81375 München (DE). MANNS, Michael [DE/DE]; Sonnenallee 23, D-30916 Isernhagen (DE). GEBHARDT, Rolf [DE/DE]; Liebigstrasse 16, D-04103 Leipzig (DE). BAHR, Matthias [DE/DE]; Kronenkamp 13, D-31303 Burgdorf (DE). BUNIATIAN, Gayane, Hrachia [AM/DE]; Paul-List-Strasse 16, D-04103 Leipzig (DE).</p> <p>(74) Anwalt: DOST, Wolfgang; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
(54) Title: USE OF PHYLLANTHUS FOR TREATING CHRONICALLY INFLAMMATORY AND FIBROTIC PROCESSES			
(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON PHYLLANTHUS ZUR BEHANDLUNG VON CHRONISCH ENTZÜNDLICHEN UND FIBROTISCHEN PROZESSEN			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to the use of Phyllanthus for preventing or treating the propagation of connective tissue. The aim of the invention is to maintain the level of reduced glutathione, to inhibit the lipopolysaccharide (LPS)-induced nitrogen monoxide synthesis (NOS) and to inhibit the expression of the cyclooxygenase (COX-2) protein.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Phyllanthus zur Prävention oder Behandlung von Bindegewebsvermehrungen, zur Erhaltung des Spiegels an reduziertem Glutathion, zur Inhibierung der Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS) sowie zur Inhibierung der Expression des Cyclooxygenase (COX-2) Proteins.</p>			
		<p>a</p> <p>MTT Absorption (%)</p> <p>Konzentration (µg/ml)</p> <p>CYTOTOXIC EFFECT</p>	
		<p>b</p> <p>MDA PRODUCTION (%)</p> <p>Konzentration (µg/ml)</p> <p>ANTIOXIDATIVE EFFECT</p>	
		<p>c</p> <p>ACETATE INCORPORATION (%)</p> <p>Konzentration (µg/ml)</p> <p>CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS INHIBITION</p>	

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Verwendung von Phyllanthus zur Behandlung von chronisch entzündlichen
und fibrotischen Prozessen**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Phyllanthus zur Prävention oder Behandlung von Bindegewebsvermehrungen, zur Erhaltung des Spiegels an reduziertem Glutathion, zur Inhibierung der Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) sowie zur Inhibierung der Expression des Cyclooxygenase (COX-2) Proteins.

Phyllanthus umfaßt eine weitverbreitete Gruppe von Pflanzen, die in Zentral- und Südindien, Taiwan, sowie Bereichen Zentral- und Mittelamerikas beheimatet ist. Unter dem Begriff Phyllanthus im Sinne dieser Erfindung sind dabei alle Vertreter der botanischen Familie Phyllanthus zu verstehen, wie Phyllanthus niruri oder insbesondere Phyllanthus amarus etc. Aus der Volksmedizin Indiens ist es bekannt, eine Vielzahl von Krankheiten mit Phyllanthus zu behandeln. So zählt beispielsweise in Band I "Doktor K.M. Nadkarni's Indian Materia Medica (3rd edition; revised and enlarged by A.K. Nadkarni)" der Autor auf, daß die Pflanze als de-obstruent, diuretisch, adstringent und kühlend bekannt ist. Ebenso werden Zusammensetzungen mit Phyllanthus zur Behandlung von Ikterus, Wassersucht, Tripper, Menorrhagie und anderen den Urogenitaltrakt betreffenden Beeinträchtigungen ähnlicher Art beschrieben. Bekannt sind weiter die Verwendung des Saftes des Stengels gemischt mit Öl als Ophthalmica oder Anwendungen gegen Geschwüre, zur Behandlung von Wunden und Schwellungen etc., wie auch die Verwendung der Blätter zur Behandlung von Juckreiz oder anderen Hautbeeinträchtigungen.

Weiter ist eine Vielzahl von Wirksubstanzen bekannt, die aus Phyllanthus isoliert werden können, Phyllanthin, Hypophyllanthin, Triacontanol, Triacontanal, Re-

- 2 -

pandusinsäure A (s. beispielsweise JP 03206044 A; AIDS-Res-Hum-Retroviruses (11/1992), Bd. 8 (11), Phyllantostatin-1, Phyllantosid, Phyllantocin, Phyllantocinsäure (s. beispielsweise EP- 173 4480; US 4,388,457), Phyllamycin A, B und C, Retrojusticidin B, Justicidin A und B (s. beispielsweise AIDS-Weekly, 25.9.95, 5 AIDS Therapies Extracts), Linolsäure, Linolensäure und Ricinoleinsäure (s. beispielsweise Journal-of-the-American-Oil-Chemists-Society Ausg. 81.06.00, Ricinoleic acid in Phyllanthus niruri), Phyllamycin D, E und F, Phyllamycinosid A, B und C (s. beispielsweise J-Nat-Prod. (11/1996), Bd. 59 (11), Six lignans from Phyllanthus niruri), Putranjivain A (s. beispielsweise Chem-Pharm-Bull (Tokyo), 10 (04/1995), Bd. 43 (4), Inhibitory effects), Ursulinsäure und Nirorisid (s. beispielsweise J-Nat-Prod 02/96, Bd. 59 (2), Nirurisode; Recl. Trav. Chim. (06/1996).

An therapeutischen Wirkungen und Anwendungen sind bisher bekannt eine altersverzögernde Wirkung (s. beispielsweise JP 08176004), Vorbeugung und Therapie von Immunschwächen wie AIDS oder Krankheiten wie Influenza, Erkältungen, 15 TBC, Hepatitis, Zirrhosen (s. beispielsweise US 5,529,778; AIDS-Weekly-Plus v. 05.08.96, Antiviral (Drug Development); Inhibition of HIV), antineoplastische Wirkung (s. beispielsweise US 4,388,457), Therapie von HIV-, HBV- und/oder HCV-Infektionen, insbesondere topische Behandlung des Karposi Sarkoms (s. beispielsweise EP 1734480; US 5,466,455), Wirkung als Proteaseinhibitor, Elastaseinhibitor und als Bleichmittel (s. beispielsweise JP 09087136), 20 analgetische und entzündungshemmende Wirkung, Wirkung als Tyrosinase-Inhibitor (s. beispielsweise JP 08012566) und eine Verwendung als Desinfektionsmittel in Kombination mit Extrakten aus anderen Pflanzen. Im übrigen sind 25 auch Verwendungen in kosmetischen Zubereitungen bekannt. An dieser Vielzahl von verschiedenen Anwendungsgebieten und isolierten Wirkstoffen ist zu erkennen, daß Phyllanthus eine durchaus bekannte Gattung von Heilpflanzen ist, die für eine Vielzahl von Indikationen und Beschwerden eingesetzt wird.

30 Ein pathologisches Phänomen, das für eine Vielzahl von anderen Beschwerden verantwortlich zu sein scheint, ist der sogenannte oxidative Streß. Darunter ver-

- 3 -

steht man die Belastung der lebenden Zelle durch Anreicherung giftiger oxidierter Verbindungen, so wie Lipidhydroperoxide, Wasserstoffperoxid, singulären Sauerstoff und Hydroxyl-Hyperoxid-Anionen. Dabei kann der Streß durch lokal produzierte oder von außen zugeführte Radikale, insbesondere sog. Reaktive Sauerstoff-Species (ROS) oder Peroxonitrit-Radikale etc. hervorgerufen werden. Der oxidative Streß kann z.B. auch durch Strahlungseinwirkung, Xenobiotika, Schwermetallionen oder Ischämie-Reperfusion (zeitweise Unterbrechung der Blutzufuhr eines Organs) induziert werden. In letzterem Falle werden durch die Xanthinoxidase, einer zu den Flavoproteinen gehörenden Oxidase von ca. 300 kD, die den Abbau der Purine katalysiert, im reichen Maße Hyperoxid-Anionen gebildet, da ihr natürlicher Elektronenakzeptor Sauerstoff ist. Unter physiologischen Bedingungen werden diese Hyperoxid-Anionen durch Superoxid-Dismutase deaktiviert, bei einer Reperfusion allerdings entstehen dabei nachgewiesenermaßen große Mengen an Sauerstoffradikalen.

Oxidativer Streß spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Reihe akuter und insbesondere chronischer Erkrankungen, z.B. Entzündungen verschiedener Art, Mikroangiopathien, Fibrose, rheumatoide Arthritis und andere rheumatische Erkrankungen, Arteriosklerose (LDL-Oxidation), Tumorentstehung und -progression, möglicherweise der Alzheimerschen Krankheit, aber auch arzneimittelinduzierte akute Schäden, wie die Paracetamol-Schädigung der Leber.

Dabei spielt die Leber als zentrales dynamisches Organ des Körpers eine wichtige Rolle in einer großen Zahl der genannten physiologischen und mikrophysiologischen Prozesse, wobei die Stoffwechselaktivitäten der Leber (Intermediärstoffwechsel) von entscheidender Bedeutung einerseits für die Versorgung weiterer Organe, andererseits aber auch für die chemische Umsetzung (Verstoffwechselung) von pharmazeutisch aktiven Substanzen sind (s. Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, de Gruyter Verlag, 1986, S. 935 - 937). Das bereits beschriebene Phänomen des oxidativen Streß wird ebenfalls größtenteils vom Körper in der Leber bekämpft. Hier befindet sich ein Reservoir unterschiedlicher reduzierter

- 4 -

Verbindungen von Antioxidantien, z.B. L-Ascorbinsäure, Karotinoide, Dihydroliponsäure, Harnsäure, Glutathion oder α -Tocopherol, welche mit Hilfe verschiedener Enzymaktivitäten (z.B. Superoxid-Dismutase, Peroxidasen wie Glutathionperoxidase, Katalase etc.) das Auftreten reaktiver Radikale verhindern.

5

Dabei wirkt sich oxidativer Streß besonders nachteilig auf eine Vielzahl von Funktionen des Lebergewebes aus. Das Lebergewebe reagiert darauf häufig mit Bindegewebsvermehrungen, welche die weitere Progression einer nachhaltigen Leberschädigung, wie beispielsweise die Entwicklung eines Lebertumors begünstigt. Dabei sind bei der Pathogenese der hepatotoxischen Wirkung vor allem Gallensäuren beteiligt.

Bei all den oben genannten Erkrankungen kommt der Balance zwischen oxidativem Streß und den Abwehrsystemen der Zellen und Organe entscheidende Bedeutung zu. Es ist daher von entscheidender prophylaktischer wie therapeutischer Bedeutung, einerseits die gesunde Leber vor oxidativem Streß zu schützen, andererseits eine erkrankte Leber zu stärken, so daß sie bereits bestehenden oxidativen Streß nachhaltig überwinden kann.

Verbindungen mit leberschützender Wirksamkeit haben z.T. erhebliche Nachteile, weil sie bei einer bereits erkrankten Leber aufgrund einer zu hohen Toxizität nicht angewendet werden können.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, leberaktive Substanzen bereitzustellen, die sowohl eine prophylaktische als auch eine therapeutische Wirkung aufweisen.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Phyllanthus zur Prävention oder Behandlung von Bindegewebsvermehrungen, insbesondere von fibrotischen Veränderungen z.B. der Leber, der Lunge, der Niere, des Pankreas, des Darms, von endokrinen Organen, der Milz, des männlichen oder weibli-

- 5 -

chen Urogenitaltraktes, der Gelenke z.B. als Folge chronisch entzündlicher Prozesse, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder chronischer Kardiomyopathien, sowie von Zirrhosen, einem fortgeschrittenen Stadium von Fibrosen.

- 5 Besonders bevorzugt ist die Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung daher bei Fibrosen und Zirrhosen, vorzugsweise Leberfibrose und Leberzirrhose. Dabei führen insbesondere chronische Entzündungszustände zu Gewebeschwund und ausgeprägter Narbenbildung mit fortschreitendem Funktionsverlust der Organe. Eine Hemmung oder Prävention der Bindegewebsvermehrung führt daher zu
10 einer weniger ausgeprägten Narbenbildung und einem Erhalt der Funktionsfähigkeit der Organe.

- Dabei geht die entsprechende Wirksamkeit von Phyllanthus bei der Verhinderung bzw. Verbesserung gerade der Leberfibrose vermutlich auf eine antioxidative
15 Wirkung zurück, wobei die Ursache von Leberfibrosen häufig in viralen Infektionen liegen. So besitzen beispielsweise alle bekannten Hepatitisviren (Hepatitis A, B, C, D, E und wahrscheinlich auch G) einen ausgesprochenen Tropismus für Leberzellen. Es ist davon auszugehen, daß selbst die derzeit in der Medizin verwendeten antiviralen Medikamente nicht zu einer Viruselimination sondern lediglich zur Unterdrückung der Virusvermehrung (Virussuppression) führen. Selbst
20 beim Verschwinden des Virus im peripheren Blut (unterhalb der Nachweisgrenze) ist das Virus oftmals noch im Lebergewebe nachweisbar. Daher kann Phyllanthus hier durch seine prophylaktische als auch therapeutische Wirkung einen vorteilhaften Effekt auf die Leberregeneration ausüben. Dabei wird zur Verminderung
25 von chronisch entzündlichen Prozessen beigetragen, wobei die sich entwickelnde Bindegewebsvermehrung in der Leber herabgesetzt wird. Bisher sind keine Medikamente bekannt, die bereits in einem so frühen Schritt einer degenerativen Entwicklung eingreifen können.

- 30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Phyllanthus zur Erhaltung des Spiegels an reduziertem Glutathion. Es konnte

- 6 -

überraschenderweise eine starke Wirksamkeit von Phyllanthusextrakten in der Aufrechterhaltung des Spiegels an reduziertem Glutathion, welches vor allem in der Leber vorkommt, gezeigt werden. Im Rahmen dieser Versuche wurde festgestellt, daß ein Extrakt von Phyllanthus in den Funktionszellen der Leber (Hepato-
5 zyten), die eine durch t-Butyl-Hydroperoxid gesteigerte Lipidperoxidation aufwiesen, nicht nur die weitere Lipidperoxidation unterdrückt, sondern sogar die endogene Lipidperoxidation fast vollständig aufgehoben wird. In vergleichenden Versuchen mit unbehandelten Hepatozyten wurde eine klare Zunahme der reduktiven Kapazität festgestellt, was auf eine verbesserte Aufrechterhaltung des intra-
10 zellulären Spiegels an reduziertem Glutathion schließen läßt.

In bevorzugten Ausführungsformen wird Phyllanthus verwendet, um die Expression von Smooth-Muscle-alpha-Aktin (SMA) mRNA und SMA-Protein zu verringern. In einer fibrotischen Leber, die eine erhöhte Zellteilungsrate aufweist,
15 kommt es zur Anreicherung (Akkumulation) von extrazellulärer Matrix. Die erhöhten Mengen an extrazellulärer Matrix werden als entscheidend für die weitere Progression einer Leberfibrose, bis hin zur Leberzirrhose erachtet. Die Anreicherung von extrazellulärer Matrix geht zurück auf die Aktivierung von speziellen Leberzellen, den hepatischen Sternzellen (HSC), die in aktivierter Form als aktivierte HSC bezeichnet werden. Aktivierte HSC produzieren im Vergleich zu nicht
20 aktivierten HSC größere Mengen an Smooth-Muscle-alpha-Aktin (SMA) mRNA und Protein, weshalb sich die Aktivierung von HSC an der Expression von SMA messen läßt. Außerdem läßt sich der Aktivierungszustand von HSC aus der Expression und intrazellulären Verteilung des Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)
25 ableiten. In Versuchsreihen konnte nun überraschenderweise festgestellt werden, daß HSC nach Behandlung mit Phyllanthusextrakten zu deutlich geringeren Mengen an extrahierbarer SMA-mRNA und SMA-Protein führen. Außerdem läßt sich mittels Immunfluoreszenz an Hand der Verteilung von SMA und GFAP nachweisen, daß Phyllanthusextrakten den normalen Phänotyp der HSC stabilisieren und
30 die Vergrößerung der Zellen im aktivierten Zustand verhindern. Ferner zeigten mit Phyllanthusextrakten behandelte HSC eine deutliche Inhibition des Zell-

- 7 -

wachstums, was die Wirksamkeit von Phyllanthusextrakten in diesen Experimenten unterstreicht. Damit besteht eine Möglichkeit aktivierte HSC, wie sie in fibrotischer Leber vorkommen, wieder in nicht aktivierte HSC zu überführen, um damit eine Regression der Leberfibrose zu begünstigen.

5

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung betreffen die Verwendung von Phyllanthus zur Inhibierung der Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), besonders bevorzugt die Inhibierung der induzierten Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) sowie die Verwendung von Phyllanthus zur
10 Inhibierung der Expression des Cyclooxygenase (COX-2) Proteins.

LPS ist eine Sammelbezeichnung für Konjugate, die aus Lipid- und Polysaccharidanteilen zusammengesetzt sind. Die in der äußeren Membran der Zellwände Gram-negativer Bakterien vorkommenden LPS sind prinzipiell aus drei Komponenten aufgebaut, nämlich Lipid A, dem Kern-Oligosaccharid und den O-spezifischen Seitenketten. Das Lipid A verankert das LPS in der bakteriellen Zellwand und ist ferner für die immunaktivierende Wirkung von bakteriellen Zellwandbestandteilen verantwortlich.
15

20 Mit Hilfe von LPS kann in Leberzellen die Expression von iNOS und COX-2 induziert werden, weshalb die stimulierten Zellen als Modellsysteme für fibrotische Leberzellen verwendet werden können, in denen die Expression dieser beiden Proteine ebenfalls erhöht ist. Sowohl iNOS als auch COX-2 ist als potenter Mediator von entzündlichen Prozessen, wie sie bei degenerativen Veränderungen
25 der Leber auftreten, bekannt. In vergleichenden Experimenten konnte nun überraschenderweise gefunden werden, daß Leberzellen, die mit LPS stimuliert und anschließend mit Phyllanthusextrakten behandelt wurden, eine deutliche Reduktion der Expressionsraten des iNOS- und des COX-2 Proteins zeigten.

30 Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung umfaßt die Verwendung in einer der oben genannten Weisen, wobei eine aus Phyllanthus isolierte Fraktion verwendet

- 8 -

wird. Unter einer isolierten Fraktion versteht man in diesem Sinne eine beispielsweise durch chromatographische Mittel, Destillation, Präzipitation, Extraktion, Filtration oder in sonstiger Weise aus *Phyllanthus* abgetrennte Untermenge von *Phyllanthus*-Substanzen. Darunter insbesondere zu verstehen sind Extrakte sowie
5 deren durch Chromatographie, Destillation, Präzipitation bzw. Extraktion abgetrennte Fraktionen.

Eine weitere erfindungsgemäße Verwendung umfaßt Verwendungen gemäß einem der vorgenannten Beispiele, bei dem eine oder mehrere aus *Phyllanthus* isolierte chemische Substanzen, insbesondere Wirkstoffe, verwendet werden. Darunter sind insbesondere auch aus *Phyllanthus*-Extrakten oder sonstigen Auszügen isolierte Einzelsubstanzen, sogenannte Naturstoffisolate, zu verstehen, wie sie beispielsweise auch aus dem Stand der Technik bekannt sind. Die Verwendung dieser isolierten Wirkstoffe birgt den Vorteil, daß im allgemeinen mit beträchtlich
10 geringeren Substanzmengen gearbeitet werden muß und dabei oft spezifischere Wirkungen als mit Gesamtextrakten oder Tabletten erreicht werden.

Bei bevorzugten Verwendungen nach einer der erfindungsgemäßen Verwendungsformen ist *Phyllanthus* ausgewählt aus einzelnen Mitgliedern der Familie
20 *Phyllanthus*, aus der Gruppe *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus niruri*, *Phyllanthus emblica*, *Phyllanthus urinaria*, *Phyllanthus myrtifolius* Moon, *Phyllanthus maderas pratensis* und/oder *Phyllanthus ussuriensis*.

In den erfindungsgemäßen Verwendungen können Blätter, Rinde, Blüten, Samen, Früchte, Stengel, Äste, Stamm, Wurzel und/oder Holz von *Phyllanthus* verwendet
25 werden, vorzugsweise die Herba-Droge, d.h. alle oberirdischen Teile der Pflanze. Dabei kann die Verwendung von *Phyllanthus* in zerkleinerter Form und/oder in unveränderter Form, d.h. als ganzes Blatt, als Granulat, Pulver, Präzipitat, Extrakt, getrockneter Extrakt und /oder Exsudat erfolgen, wobei Extrakte oder getrocknete
30 Extrakte bevorzugt sind.

- 9 -

Die Herstellung von Phyllanthus zur erfindungsgemäßen Verwendung umfaßt die Herstellung von Phyllanthuspulver oder -granulat aus einem der vorgenannten Pflanzenteile, Extraktion aus Pflanzen, zerkleinerten Pflanzenteilen, Pulvern, so wie auch an bereits vorher mit anderen Lösungsmitteln behandelten Resten mit
5 Hexan, Wasser, Methanol und/oder anderen Alkoholen. Dazu gehören auch Filtration und Vakuum-Evaporation, um einen getrockneten Extrakt zu erhalten. Eine weitere Methode umfaßt die mehrphasige Extraktion mit wäßrigen und/oder alkoholischen und/oder polaren Lösungsmitteln. Üblich ist auch die Filtration, beispielsweise durch Zellulosefilter, die Präzipitation, vorzugsweise mit Hilfe von
10 Ethanol, oder die Trennung durch Ultrazentrifugation sowie eine Mazeration. Dabei kann stets bei erhöhten oder erniedrigten Temperaturen gearbeitet werden.

Besonders bevorzugt ist hier die Verwendung von Phyllanthus in Form eines wäßrigen, lipophilen oder alkoholischen Extrakts, wobei der alkoholische Extrakt,
15 vorzugsweise mit kurzkettigen (C1 bis C4) primären Alkoholen oder Mischungen davon, insbesondere Methanol oder Ethanol, durchgeführt wird, der lipophil mit C5-C10, verzweigt oder unverzweigt, kettigen Kohlenwasserstoffen, oder Mischungen davon, vor allem mit n-Hexan.

20 Desweiteren eignen sich als Extraktionsmittel Essigsäureethylester oder entsprechende organische Lösungsmittel/Wasser-Mischungen, vorzugsweise Methanol-/Wassermischungen oder Ethanol-/Wassermischungen. Ein geeignetes Extraktionsverfahren ist beispielsweise im U.S. Patent No. 4,673,575 oder U.S. Patent No. 4,937,074 offenbart.

25

Phyllanthus wird bei erfindungsgemäßen Verwendungen bevorzugt in Form eines oder mehrerer Heilmittel (s. Römp, Lexikon Chemie, Version 1.4), wie einer Infusionslösung, Injektionslösung, Tablette, eines Granulats, einer Salbe, einer Heilpackung, Klysmen und/oder in Form eines oder mehrerer Lebensmittel-
30 /Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt. Damit umfaßt sind die üblichen medizinischen und therapeutischen Anwendungen und insbesondere auch die als Nah-

- 10 -

runrgergänzungsmittel, wobei hier zur Prophylaxe und auch als funktionelles Antioxidans Phyllanthus als natürlicher und ungefährlicher Zusatz zu Nahrungsmitteln verwendet werden kann und dabei auch präventiv die genannten therapeutischen und funktionellen Effekte zeigt.

5

Die Verwendung von Phyllanthus in den erfindungsgemäßen Verwendungen kann oral, topisch, und/oder parenteral erfolgen.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform wird zusätzlich zu Phyllanthus noch ein oder mehrere andere Wirkstoffe und/oder geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe verwendet. Unter dem Begriff Wirkstoff werden im Sinne dieser Erfindung therapeutisch wirksame Stoffe wie z.B. Vitamin C oder Tocopherole, insbesondere α -Tocopherol, verstanden, die als Antioxidantien oder als Wirkstoffe gegen oxidativen Streß bekannt sind, sowie z.B. entzündungshemmende Stoffe. Damit umfaßt sind damit auch sog. Kombipräparate mit Phyllanthus. Dabei ist insbesondere auch zu beachten, daß die erfindungsgemäßen Verwendungen keineswegs nur auf jeweils eine Form, Fraktion oder isolierten Wirkstoff von Phyllanthus beschränkt sind, bei einer Verwendung auch mehrere verschiedene Formen und/oder Fraktionen und/oder isolierten Wirkstoff von Phyllanthus verwendet werden können.

20

Unter Hilfs- und Zusatzstoffen versteht man im Sinne dieser Erfindung Stoffe, die bekanntermaßen für therapeutische Anwendungen oder als Anwendung zur Nahrungsergänzungsmittel hinzugefügt werden, um einen entsprechenden Einsatz zu erlauben oder erleichtern, so z.B. Adjuvantien, Spreng- und Gleitmittel, Füllstoffe, Puffer, Konservierungsmittel, Stabilisatoren etc..

25

Die folgenden Beispiele und Figuren sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken. Darin zeigt:

30

- Figur 1 die Ergebnisse von Radikalfänger-Versuchen mit 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) und den erfindungsgemäßen Phyllanthus-extrakten;
- Figur 2 die Ergebnisse von Radikalfänger-Versuchen mit DPPH und Vitamin C als Vergleich;
- 5 Figur 3 die Ergebnisse von Radikalfänger-Versuchen mit DPPH und α -Tocopherol als Vergleich;
- Figur 4 die Ergebnisse von Radikalfänger-Versuchen mit 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid (MTT) und den erfindungsgemäßen Phyllanthusextrakten;
- 10 Figur 5 die Ergebnisse von Radikalfänger-Versuchen mit MTT und Vitamin C als Vergleich;
- Figur 6 die Ergebnisse von Radikalfänger-Versuchen mit Cytochrom und den erfindungsgemäßen Phyllanthusextrakten;
- 15 Figur 7 die Ergebnisse von Radikalfänger-Versuchen mit Cytochrom und Vitamin C als Vergleich;
- Figur 8 die Ergebnisse von Radikalfänger-Versuchen mit Natrium-3'[[I-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzen-sulfonsäurehydrat/Phenanzin methosulfat (XTT/PMS) und den erfindungsgemäßen Phyllanthusextrakten;
- 20 Figur 9 die Ergebnisse von Radikalfänger-Versuchen mit XTT/PMS und Vitamin C als Vergleich;
- Figur 10a-c die Wirkung von Phyllanthusextrakten auf Leberzellen (Hepatozyten);
- 25 Figur 11 die inhibierende Wirkung von Phyllanthusextrakten auf die LPS-induzierte Expression der NOS anhand der reduzierten NO Produktion;
- Figur 12 die inhibierende Wirkung eines Ethanol/Wasser-Extraktes von Phyllanthus auf die LPS-induzierte iNOS Expression;
- 30 Figur 13 die inhibierende Wirkung eines Hexan-Extraktes von Phyllanthus auf die LPS-induzierte COX-2 Expression; und

- 12 -

Figur 14 die inhibierende Wirkung eines Ethanol/Wasser-Extraktes von Phyllanthus auf die LPS-induzierte COX-2 Expression;

5 Beispiel 1:

Herstellung eines erfindungsgemäßen getrockneten Extraktes
(Fraktion 1; Lot-No.: 9810H)

2 kg der Herba-Droge eines in Madras, Indien kultivierten Phyllanthus amarus
10 wurde zu 450 g Pulver verarbeitet. Diese 450 g Pulver wurden für 12 h mit 3 l
destilliertem n-Hexan in einem Soxhlet Apparat extrahiert. Nach Filtration und
Vakuumevaporation wurden 25 g getrockneter n-Hexan-Extrakt gewonnen, des-
sen Hauptbestandteile lipophile Lignane, Sterole und Pigmente waren. Der Ex-
trakt war eine grau-braune Paste, die in Wasser und Methanol unlöslich und in
15 Ethyl-Acetat löslich war.

Beispiel 2:

Herstellung eines getrockneten Methanol-Extraktes
20 (Fraktion 2; Lot-No.: 9810M)

Der Rest des n-Hexan unlöslichen Pflanzenrückstands aus Beispiel 1 wurde 24 h
sukzessive mit 3 l destilliertem Methanol in einem Soxhlet-Apparat extrahiert.
Nach Filtration und Vakuumevaporation wurden 50 g getrockneter Methanol-
25 Extrakt gewonnen. Die Hauptbestandteile sind Flavonoide, oligomere Gallotanni-
ne und Phenolcarbonsäuren. Das dunkelbraune Pulver war unlöslich in Wasser
und fast komplett in Methanol löslich.

- 13 -

Beispiel 3:

Herstellung eines wässrigen Überstandes

(Fraktion 3; Lot-No.: 9810Ws)

- 5 Der nach Methanolextraktion (s. Beispiel 2) zurückbleibende methanolunlösliche Pflanzenrest (ca. 375 g) wurde mit 2,5 l destilliertem Wasser heiß infundiert und dann über 12 h kalt mazeriert (+4° C). Nach Filtration des warmen Wassserextraktes wurden 2,5 l Ethanol (100 % (=1:1)) tröpfchenweise hinzugefügt, um ein Präzipitat der hochmolekularen Disaccharide und Glykoproteine zu erreichen, die
- 10 durch Ultrazentrifugation bei 7500 rpm getrennt wurden. Die lyophilisierte überstehende Phase ergab 15 g Trockenmaterial. Hauptbestandteile waren oligomere Gallotannine und andere wasserlösliche Polymere. Ergebnis war ein rot-braunes Pulver, das in Wasser löslich und unlöslich in organischen Lösungsmittel war.

15

Beispiel 4:

Herstellung eines Wasserpräzipitats

(Fraktion 4; Lot-No.: 9810pp)

- 20 Die Ethanol-präzipitierten und zentrifugierten polymeren Anteile gem. Beispiel 3 wurden in heißem Wasser gelöst und lyophilisiert. Ausgehend von 450 g rohem Pulvers werden 5 g Extrakt gewonnen. Hauptbestandteile sind hochmolekulare Polysaccharide und Glykoproteine. Das entstehende Produkt war ein braunes Pulver, daß in Wasser unlöslich war.

25

Beispiel 5:

Herstellung eines chlorophyllfreien Methanol-Rohextraktes

(Fraktion 5; Lot-No.: 9901Mcf; P1159)

30

- 14 -

100 g Phyllanthuspulver aus der Herba-Droge wurden mit 500 ml destilliertem Methanol in einem Soxhlet-Apparat für 12 h extrahiert. Filtration und Vakuum-
evaporation lieferte 15 g getrockneten Extrakt, der in 300 ml einer Mischung aus
destilliertem Wasser und Methanol im Verhältnis 1:1 heiß aufgelöst wurde. Die
5 Lösung wurde auf einem Wasserbad von 80°C unter gelegentlichem Umrühren
auf das halbe Volumen reduziert. Das ölige Präzipitat wurde durch Heißfiltration
(80°C) durch Zellulosepapier entfernt. Zum Filtrat wurde heißes destilliertes Was-
ser (80°C) zugegeben und bis 300 ml aufgefüllt und danach erneut filtriert. Lyo-
philisation des Filtrats ergab ca. 10 g getrockneten Methanolextrakt. Dieser hatte
10 das Aussehen einer braunen Paste und war in Methanol löslich.

Beispiel 6:

Herstellung eines chlorophyllfreien Wasserextraktes

15 (Fraktion 6; Lot-No.: 9901 Wcf)

50 g Phyllanthus-Pulver aus der Herba-Droge wurden 1 h mit 500 ml destilliertem
Wasser auf einem Wasserbad von 80-100° C unter gelegentlichem Rühren ausge-
kocht. Die heiße Lösung wurde durch ein Zellulosepapier gefiltert. Zu dem Filtrat
20 (ca. 400 ml) wurden 100 ml destilliertes Methanol hinzugefügt. Die Mixtur wurde
unter gelegentlichem Rühren auf einem Wasserbad von 80°C auf das halbe Vo-
lumen evaporiert. Das ölige Präzipitat wurde durch heiße Filtration (80°C) durch
Zellulosepapier abgetrennt. Lyophilisieren des Filtrats ergab 3g getrockneten
Wasserextraktes. Dieser Extrakt war ein rot-braunes Pulver, das in Methanol lös-
25 lich war.

Beispiel 7:

Radikalfängerversuch mit DPPH

30

- 15 -

7 verschiedene Konzentrationen eines erfindungsgemäßen Extraktes genannt P 11599 gem. Beispiel 5 wurden in einem Radikalfängerversuch auf ihre Fähigkeit zum Abfangen von Radikalen untersucht. Dazu wurde der Farbumschlag zwischen einem stabilen Radikal DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) und dem zugehörigen Nicht-Radikal 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazin bei 515 nm gemessen. Dabei wurden die Testsubstanzen in DMSO in Verdünnungsreihen und Doppelbestimmungen mit einer DPPH-Lösung in Methanol über 30 min bei 37°C inkubiert und der Farbumschlag gemessen. Aus den Ergebnissen wurde der SC50-Wert bestimmt, die Konzentration an Probe, bei der 50% der DPPH-Radikale abgefangen werden. DMSO wurde als negative und Ascorbinsäure als positive Kontrolle verwendet und - wie auch α -Tocopherol - vermessen. Als SC50-Werte wurden 6,2 $\mu\text{g/ml}$ für P11599, 10 μM für Ascorbinsäure, und 18 μM für α -Tocopherol (s. Abb. 1 – 3) bestimmt. Wie man den Kurven und Ergebnissen entnehmen kann, war P11599 ein besserer Radikalfänger als α -Tocopherol und der Ascorbinsäure ebenbürtig.

Beispiel 8:

Radikalfängerversuch mit MTT

MTT (3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) wurde in einer Konzentration von 10,6 mM 1 h bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen eines erfindungsgemäßen Extrakts P11599 gem. Beispiel 5 bzw. mit Ascorbinsäure als Referenz inkubiert und die Änderung der Absorption durch die Wirkung der Proben photometrisch bestimmt. Als Ergebnis ist eine außerordentlich hohe antioxidatives Potential von P11599 festzustellen, das dem des relativ starken Reduktionsmittels Ascorbinsäure ähnelt (s. Abb. 4 und 5).

Beispiel 9:

Radikalfängerversuch mit Cytochrom c

- 16 -

Cytochrom c wurde in einer Konzentration von 150 μ M 0,5 h bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen eines erfindungsgemäßen Extrakts P11599 gem. Beispiel 5 bzw. mit Ascorbinsäure als Referenz inkubiert und die Änderung der Absorption durch die Wirkung der Proben photometrisch bestimmt. Als Ergebnis ist eine außerordentlich hohes antioxidatives Potential von P11599 festzustellen, das dem des relativ starken Reduktionsmittels Ascorbinsäure ähnelt (s. Abb. 6 und 7).

10 Beispiel 10:

Radikalfängerversuch mit XTT/PMS

XTT/PMS (Natrium 3' [I-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzen-sulfonsäurehydrat/Phenanzin methosulfat) wurde in einer Konzentration von 500 μ M/0,2 l) 1 h bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen eines erfindungsgemäßen Extrakts P11599 gem. Beispiel 5 bzw. mit Ascorbinsäure als Referenz inkubiert und die Änderung der Absorption durch die Wirkung der Proben photometrisch bestimmt. Als Ergebnis ist ein außerordentlich hohes antioxidatives Potential von P11599 festzustellen, das dem des relativ starken Reduktionsmittels Ascorbinsäure ähnelt (s. Abb. 8 und 9).

Beispiel 11:

Messung der cytotoxischen Wirkung und Einfluß auf Reduktionskapazität der Zellen

Gemäß Versuchsprotokoll von Gebhardt R. (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144, 279-286 wurde an kultivierten Rattenhepatozyten die cytotoxische Wirkung eines erfindungsgemäßen Extrakts P11599 gem. Beispiel 5 in verschiedenen Konzentrationen getestet. Dabei war - gemessen über die MTT-Absorption [%] - bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml keine cytotoxische Wirkung auf Hepatozyten

- 17 -

nachweisbar (Abb. 10). Als weiteres überraschendes Ergebnis zeigt diese Experiment durch den Anstieg der Kurve, daß unter der Wirkung des erfindungsgemäßen Extraktes sogar die reduktive Kapazität der Zellen zunimmt, was einer Erhöhung der Reduktionskapazität zur Erhaltung des Glutathion-Spiegels entspricht (Abb. 10).

Beispiel 12:

Messung der Verringerung der Smooth-Muscle-alpha-Aktin (SMA) Expression

Es wurden ruhende hepatische Sternzellen aus einer Rattenleber durch Perfusion der Rattenleber in situ mittels Kollagenase und Pronase gewonnen. Aus der resultierenden Zellsuspension wurden die hepatischen Sternzellen (HSC) über einen Dichtegradienten mit NycodenzTM gereinigt. Anschließend wurden die isolierten HSC in Zellkultur genommen (ruhender, nicht aktivierter Phänotyp). Unter Standard-Kultivierungsbedingungen in Nährkulturmedium (DMEM, 18 % fötales Kälberserum, herkömmlich zu beziehen bei Sigma, Deisenhofen, Deutschland) findet eine spontane Aktivierung der HSC (aktivierter Phänotyp) statt. Zur weiteren Aktivierung wurden die HSC in Zellkultur passagiert. Diese Zellen wurden morphologisch und immun-histochemisch als myofibroblastische HSC charakterisiert.

Für die Durchführung der eigentlichen Testreihen wurden dem Nährkulturmedium der aktivierten HSC erfindungsgemäße Phyllanthusextrakte (25 % Ethanol LAT-Nr. 02700514, 50 % Ethanol LAT-Nr. 0271614, 75 % Ethanol LAT-Nr. 0272514) gelöst in DMSO in Konzentrationen von 20 µg/ml, 60 µg/ml und 200 µg/ml zugesetzt. Anschließend wurden die behandelten HSC für vier Tage in Nährkulturmedium inkubiert. Nach der Ernte der HSC wurde nach herkömmlichen Verfahren gesamtzelluläre RNA isoliert, deren Konzentration und Qualität spektrophotometrisch und mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Der Nachweis der Ex-

- 18 -

pression der SMA mRNA erfolgte mittels dem im Stand der Technik bekannten Northernblot-Verfahren.

Bei allen getesteten Phyllanthusextrakten führte der Zusatz von 200 µg/ml zu einer deutlichen Inhibition des Wachstums der HSC in Zellkultur und einer wesentlich geringeren Menge an isolierter gesamtzellulärer RNA. Im Northernblot wurde eine ebenfalls deutliche Reduktion der Expression der SMA mRNA beobachtet, die sich bei Verwendung des 50 % Ethanolextraktes bereits bei einer Konzentration von 60 µg/ml zeigte.

Beispiel 13:

Messung der Verringerung der Expression der LPS-induzierten Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), des induzierten NOS Proteins (iNOS) und des Cyclooxygenase (COX-2) Proteins

Für die Messung der Stickstoffmonoxid (NO) Produktion, welche durch NOS erfolgt, wurden Makrophagen verwendet, die in RPMI Nährkulturmedium mit 10 % fötalem Kälberserum (herkömmlich zu beziehen bei Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert wurden. Die Zellen wurden anschließend mit LPS (1 µg/ml) stimuliert und für 24 h mit oder zur Kontrolle ohne Phyllanthusextrakte inkubiert. Die NO Konzentration wurde mittels Griess Assay (Kiemer, A. und Vollmar, A. (1998), J. Biol. Chem. 273(22):13444-13451) bestimmt.

Bei den getesteten Phyllanthusextrakten reduzierten vor allem ein Hexanextrakt (LAT-Nr. 01600514) bereits in einer Konzentration von 12,5 µg/ml und ein Ethanol/Wasser Extrakt (LAT-Nr. 00690514) in einer Konzentration von 250 µg/ml wirksam die NO Produktion. Eine Reduktion der LPS-induzierten iNOS und COX-2 Proteinexpression wurde bei Konzentrationen von 125 µg/ml Hexanextrakt und Ethanol/Wasser Extrakt festgestellt (Abb. 11 - 14).

- 19 -

Patentansprüche

1. Verwendung von Phyllanthus zur Prävention oder Behandlung von Bindegewebsvermehrungen, vorzugsweise einer Fibrose und/oder einer Zirrhose, besonders bevorzugt einer Leberfibrose und/oder einer Leberzirrhose.
5
2. Verwendung von Phyllanthus zur Erhaltung des Spiegels an reduziertem Glutathion.
- 10 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression von Smooth-Muscle-alpha-Aktin (SMA) und/oder Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) mRNA verringert wird.
4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression von SMA und/oder GFAP Protein verringert wird.
15
5. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Reduktion der SMA und/oder GFAP Expression in hepatischen Sternzellen (HSC) erfolgt.
20
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß aktivierte HSC in nicht-aktivierte HSC überführt werden.
7. Verwendung von Phyllanthus zur Inhibierung der Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS).
25
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des induzierten NOS Proteins (iNOS) inhibiert wird.
- 30 9. Verwendung von Phyllanthus zur Inhibierung der Expression des Cyclooxygenase (COX-2) Proteins.

- 20 -

10. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet,
daß eine aus *Phyllanthus* isolierte Fraktion verwendet wird.
- 5 11. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet,
daß eine oder mehrere aus *Phyllanthus* isolierte chemische Substanzen, insbesondere Wirkstoffe, verwendet werden:
12. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet,
10 daß *Phyllanthus* ausgewählt ist aus der Gruppe *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus niruri*, *Phyllanthus emblica*, *Phyllanthus urinaria*, *Phyllanthus myrtifolius* Moon, *Phyllanthus maderas pratensis* und/oder *Phyllanthus ussuriensis*.
13. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet,
15 daß Blätter, Rinde, Blüten, Samen, Früchte, Stengel, Äste, Stamm, Wurzel und/oder Holz von *Phyllanthus*, vorzugsweise die Herba-Droge, verwendet werden.
14. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet,
20 daß *Phyllanthus* in zerkleinerter Form und/oder in unveränderter Form als Granulat, Pulver, Präzipitat, Extrakt, getrockneter Extrakt und/oder Exsudat eingesetzt wird, vorzugsweise als Extrakt oder getrockneter Extrakt.
15. Verwendung gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß ein wässriger,
25 unpolarer, vorzugsweise mit C5-C10, verzweigt oder unverzweigt, -kettigen Kohlenwasserstoffen, oder Mischungen davon, vor allem mit n-Hexan , und/oder alkoholischer Extrakt, vorzugsweise mit kurzkettigen (C1 – C4) primären Alkoholen oder Mischungen davon, insbesondere Methanol oder Ethanol, verwendet wird.

- 21 -

16. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Anwendung in Form einer Infusionslösung, Injektionslösung, Tablette, Granulats, Salbe, Klysmen, Heilpackung und/oder Nahrungsergänzungsmittel erfolgt.

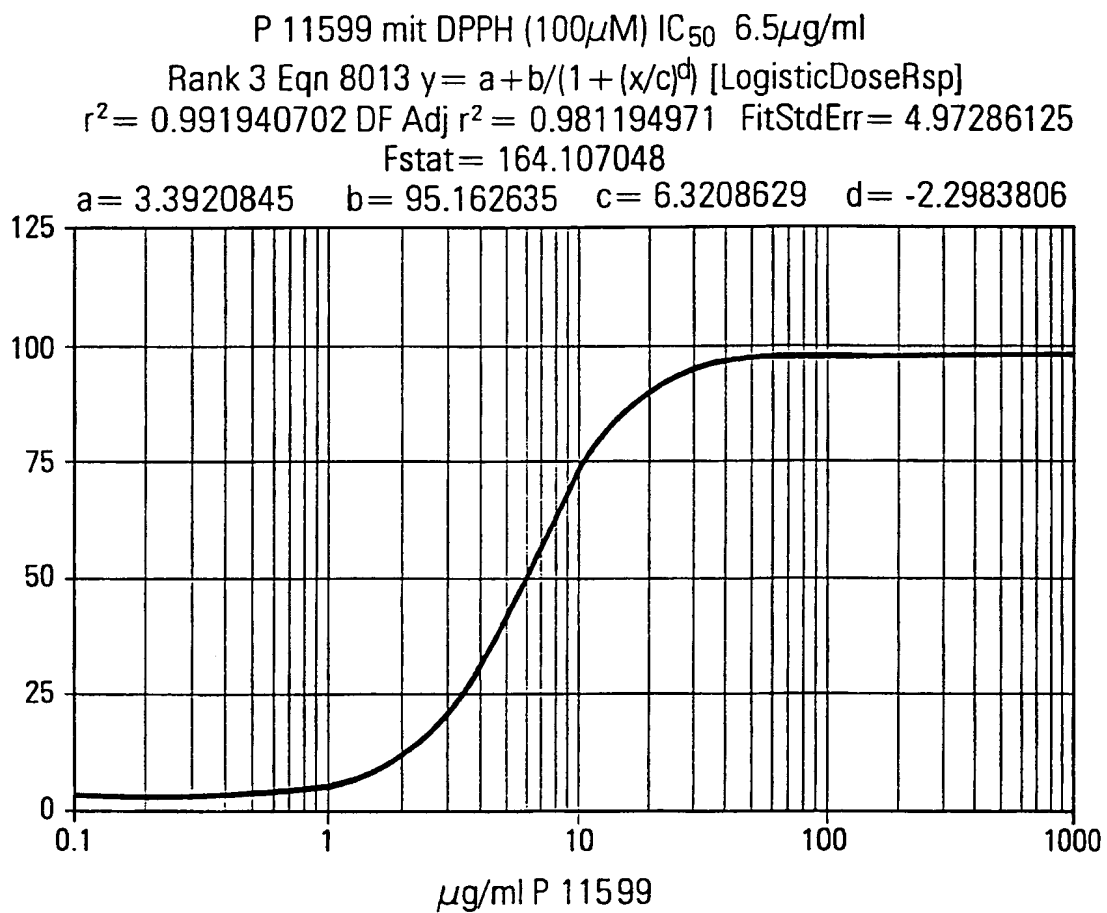
5

17. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Anwendung oral, topisch und/oder parenteral erfolgt.

18. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet,
10 daß zusätzlich zu Phyllanthus andere Wirkstoffe verwendet werden und/oder gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

19. Verwendung gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß Ascorbinsäure und/oder Tocopherole verwendet werden.

1/14

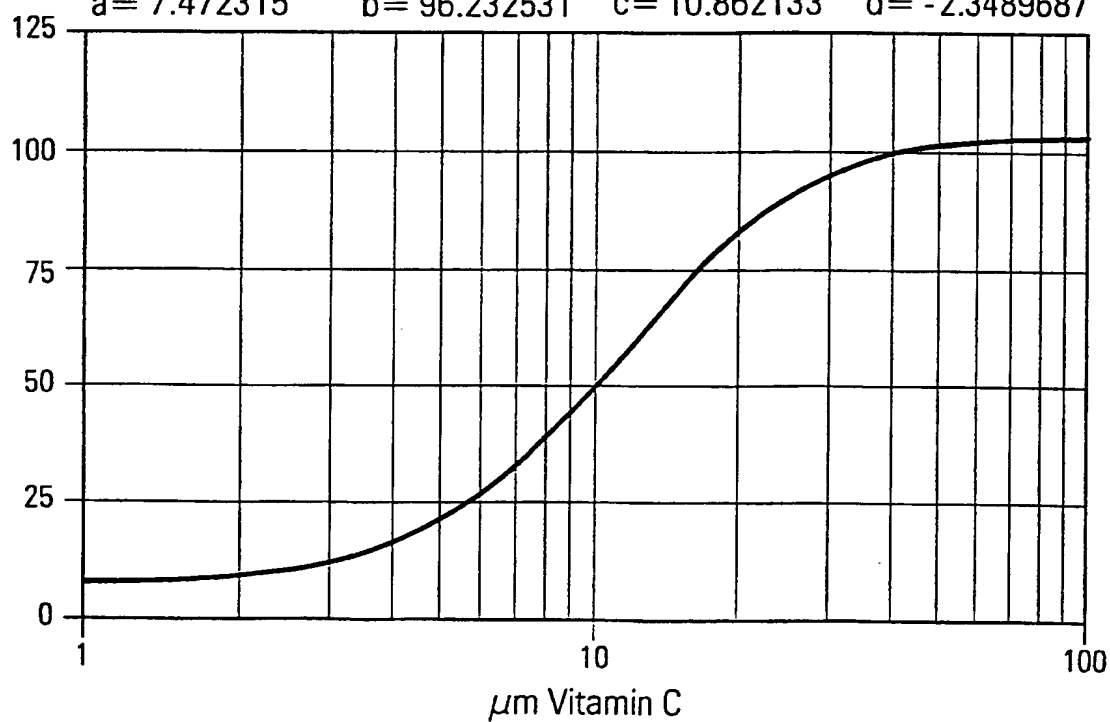
Abb.1

2/14

Abb.2Vitamin C mit DPPH (100 μ M) IC₅₀ 10.2 μ mRank 3 Eqn 8013 $y = a + b / (1 + (x/c)^d)$ [LogisticDoseRsp] $r^2 = 0.998362066$ DF Adj $r^2 = 0.991810332$ FitStdErr = 2.60557098

Fstat = 406.350233

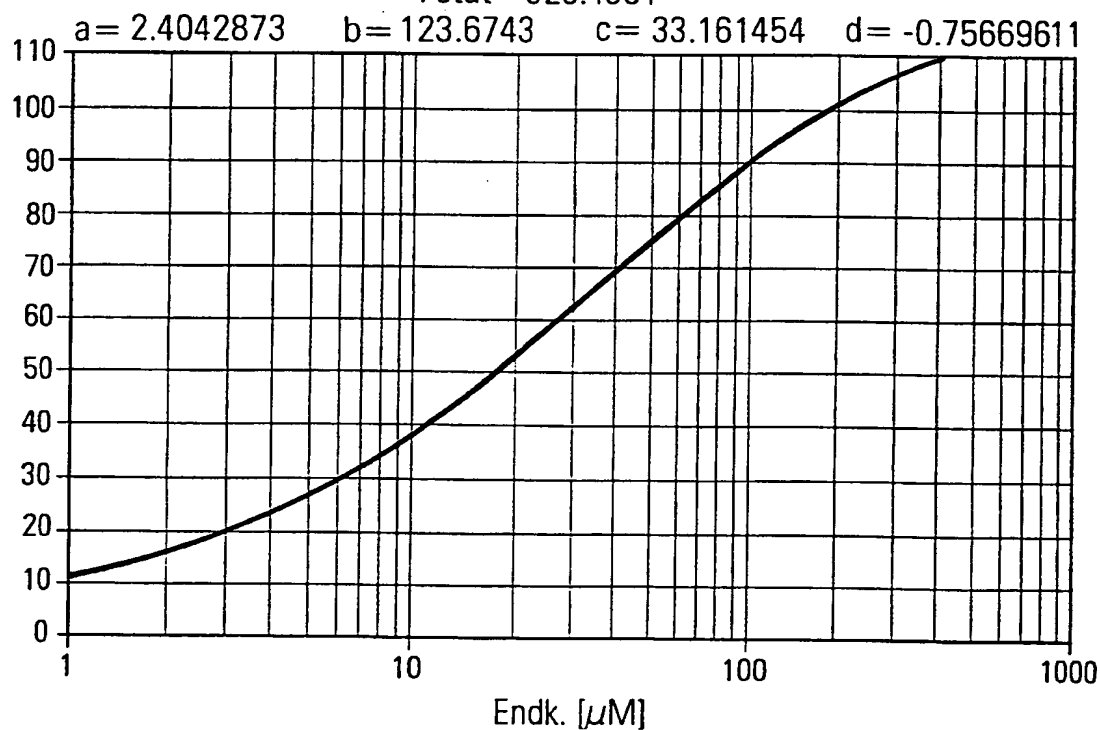
a = 7.472315 b = 96.232531 c = 10.862133 d = -2.3489687



3/14

*Abb. 3*Radikalfängertaktivität von α -TocopherolRank 1 Eqn 8013 $y = a + b/(1 + (x/c)^d)$ [LogisticDoseRsp] $r^2 = 0.995956771$ DF Adj $r^2 = 0.990565799$ FitStdErr = 2.67111068

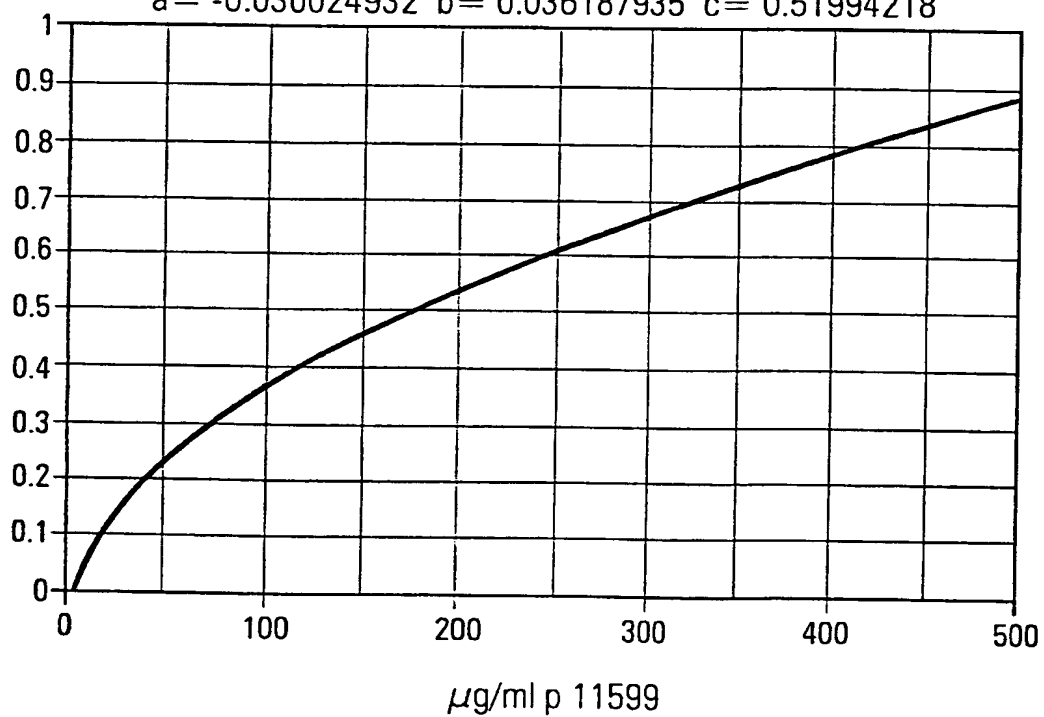
Fstat = 328.4361



4/14

Abb.4

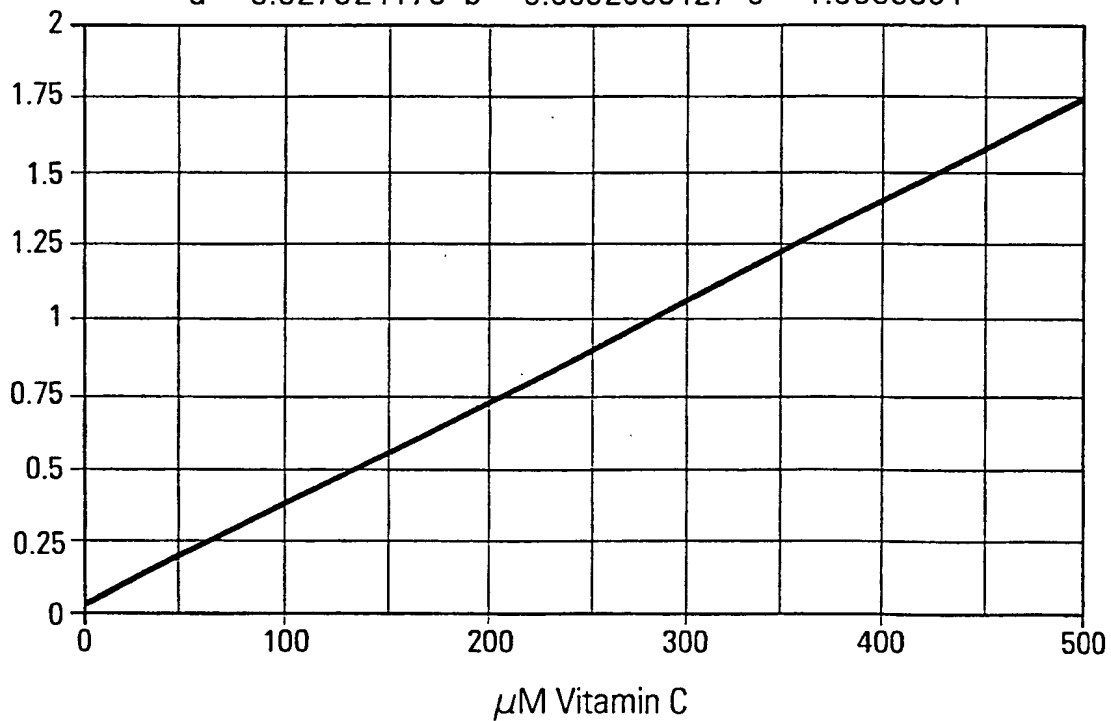
P11599 mit MTT (10.6mM) 1h
Rank 3 Eqn 8010 $y = a + bx^c$ [Power]
 $r^2 = 0.998714918$ DF Adj $r^2 = 0.997751104$ FitStdErr = 0.0125040889
Fstat = 194289876
 $a = -0.030024932$ $b = 0.036187935$ $c = 0.51994218$



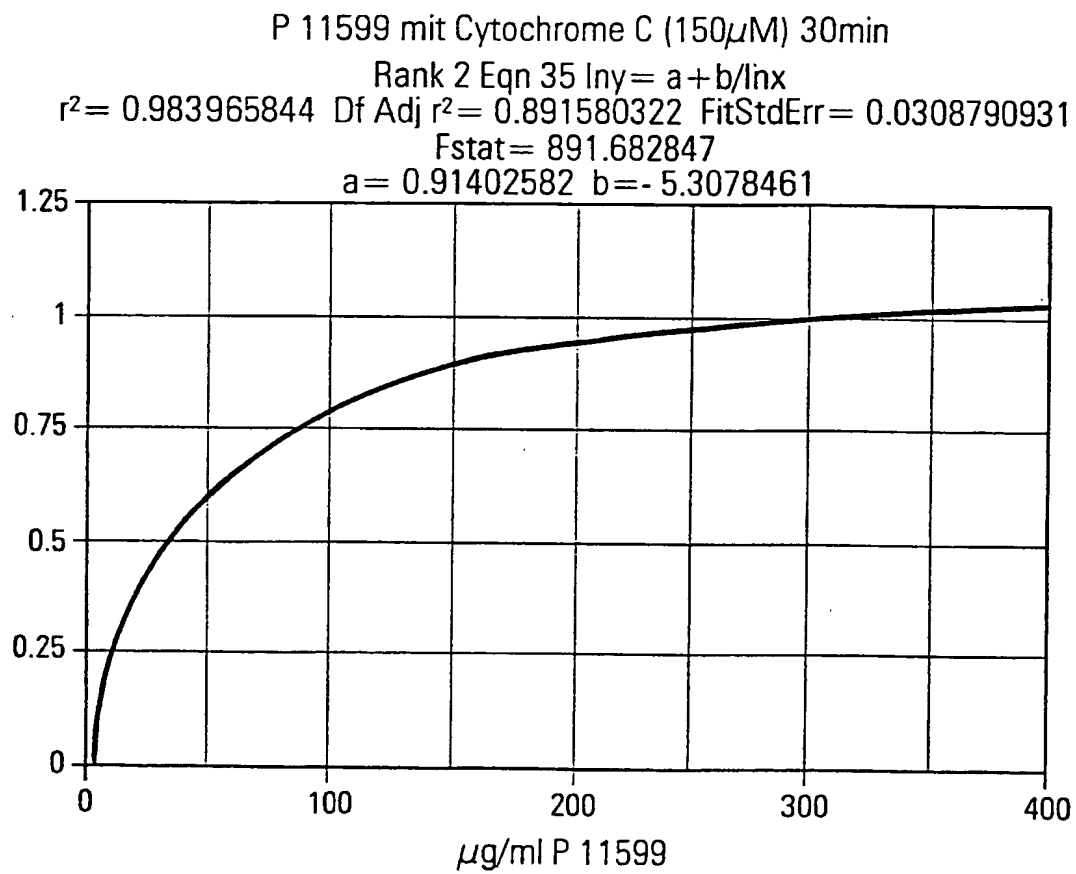
5/14

Abb.5

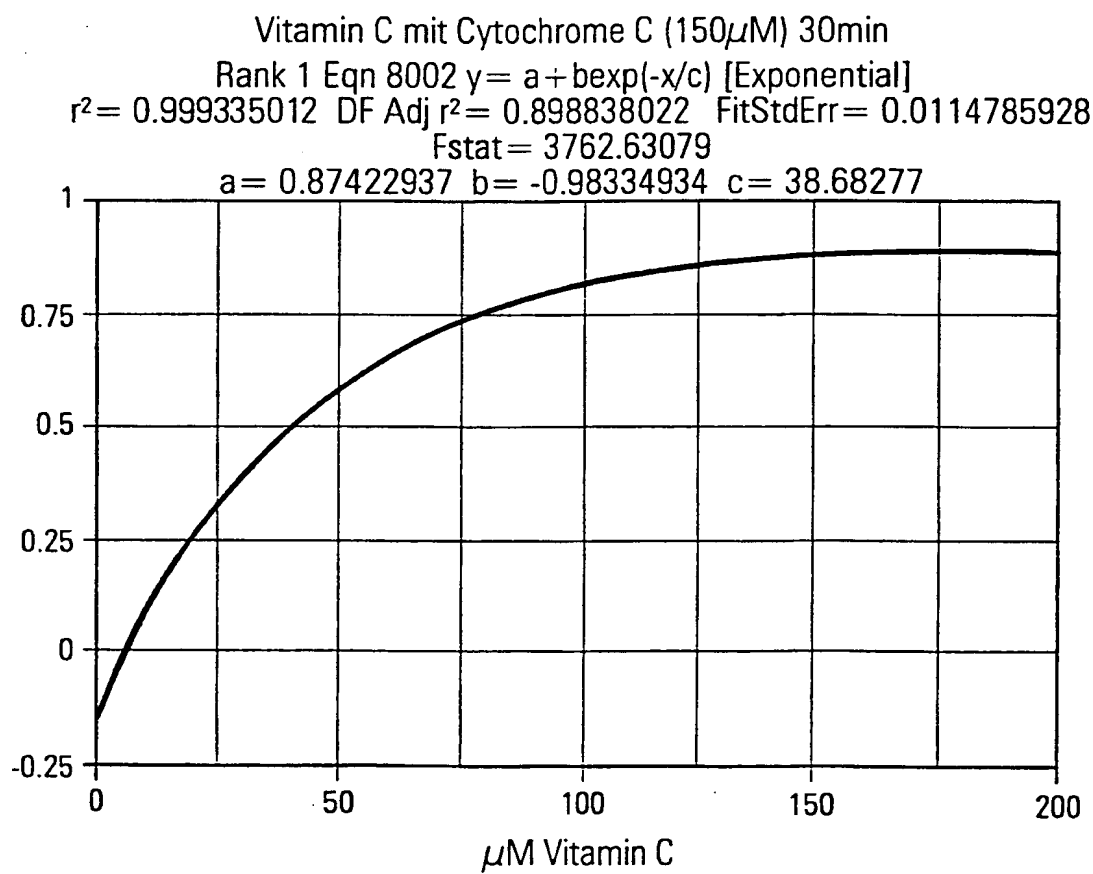
Vitamin C mit MTT(10.6mM) 1h
Rank 1 Eqn 8010 $y = a + bx^c$ [Power]
 $r^2 = 0.999859939$ DF Adj $r^2 = 0.999754894$ FitStdErr = 0.00833854772
Fstat = 17846.9089
 $a = 0.027324179$ $b = 0.0032966427$ $c = 1.0069804$



6/14

Abb.6

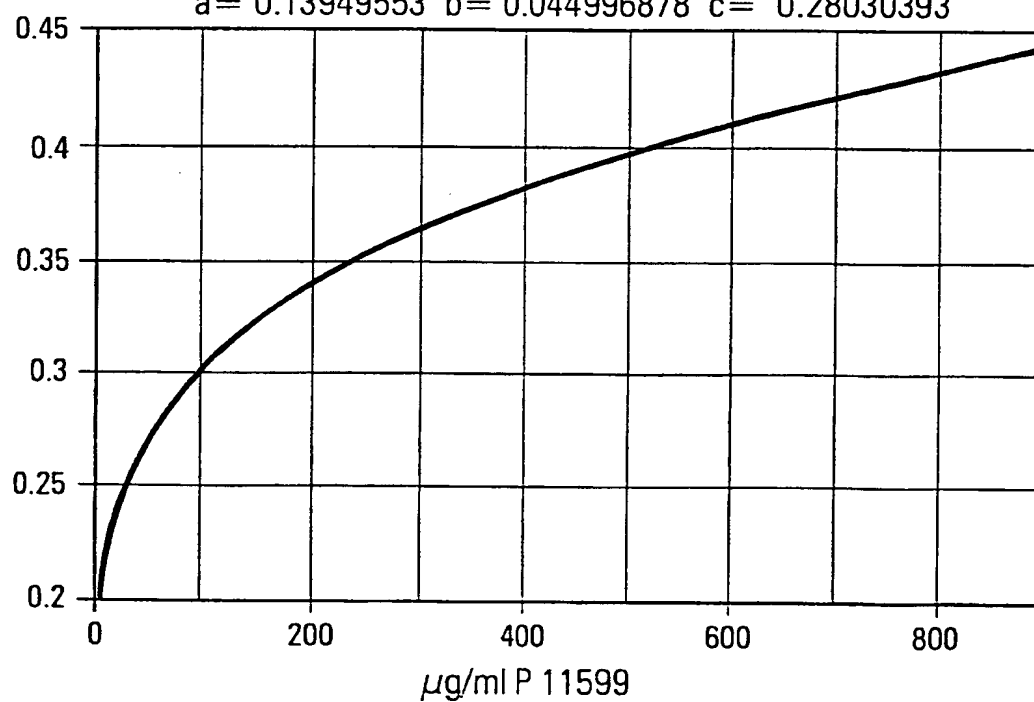
7/14

Abb. 7

8/14

Abb.8P 11599 mit XTT/PMS (500 μ M/0.21 μ M) 1hRank 1 Eqn 8010 $y = a + bx^c$ [Power] $r^2 = 0.996805758$ DF Adj $r^2 = 0.884060076$ FitStdErr = 0.0053453386

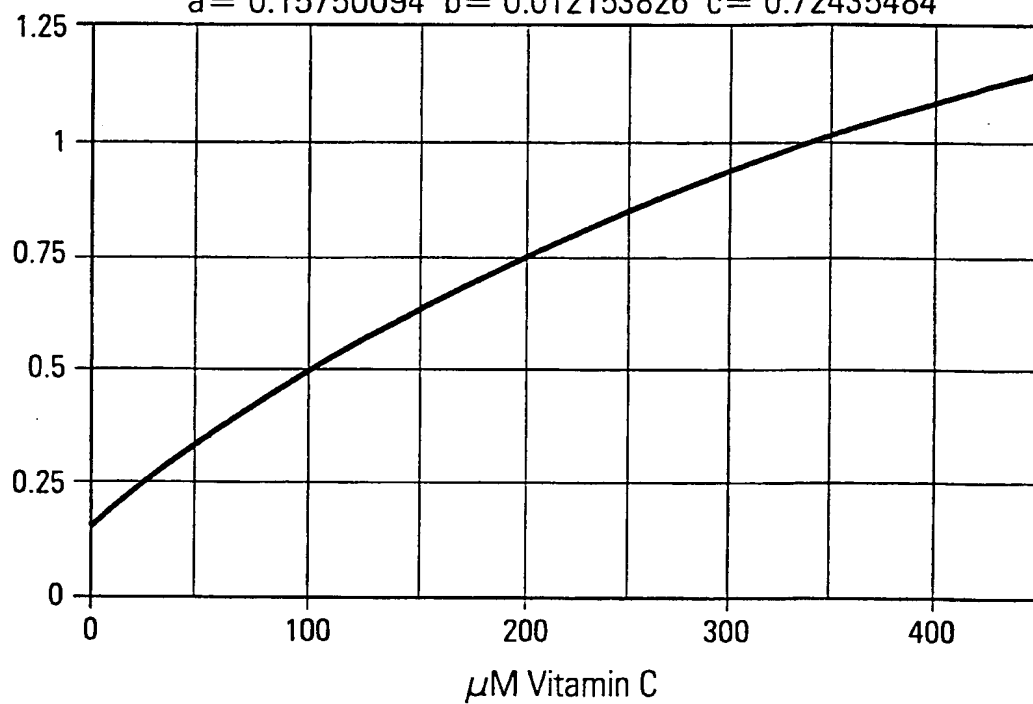
Fstat = 734.041461

 $a = 0.13949553$ $b = 0.044996878$ $c = 0.28030393$ 

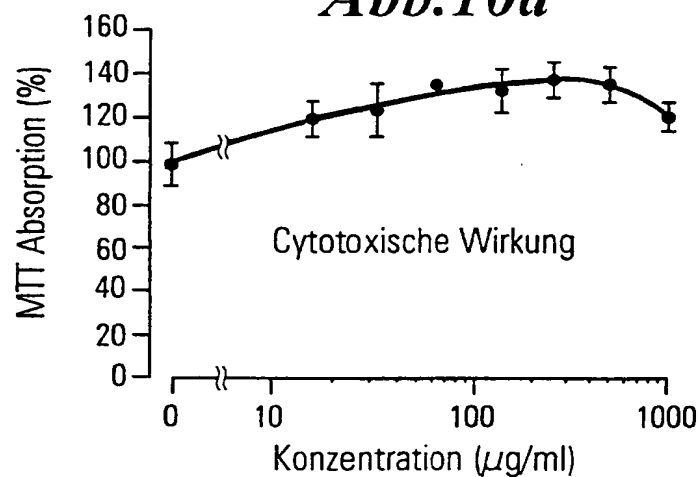
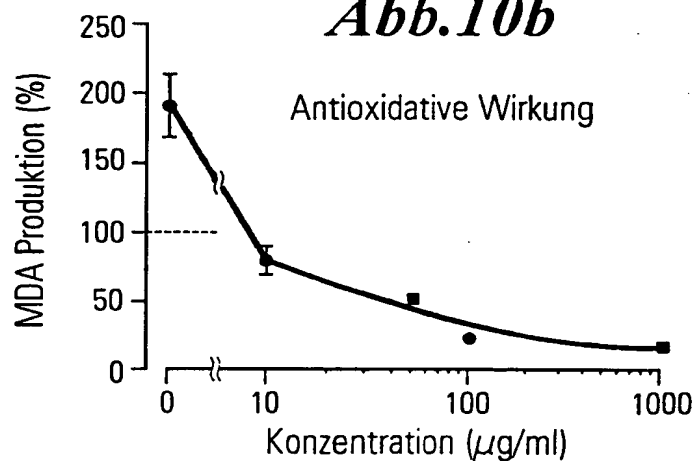
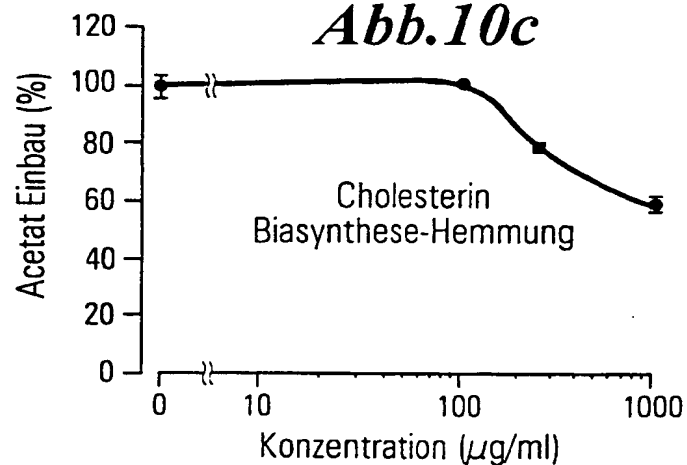
9/14

Abb.9Vitamin C mit XTT/PMS (500 μ M/0.21 μ M) 1hRank 2 Eqn 8010 $y = a + bx^c$ [Power] $r^2 = 0.8959999$ DF Adj $r^2 = 0.992999828$ FitStdErr = 0.0243739861

Fstat = 622.484431

 $a = 0.15750094$ $b = 0.012153826$ $c = 0.72435484$ 

10/14

Abb. 10a**Abb. 10b****Abb. 10c**

11/14

Abb. 11

Phyllanthus amarus inhibits NO production
in LPS-activated macrophages

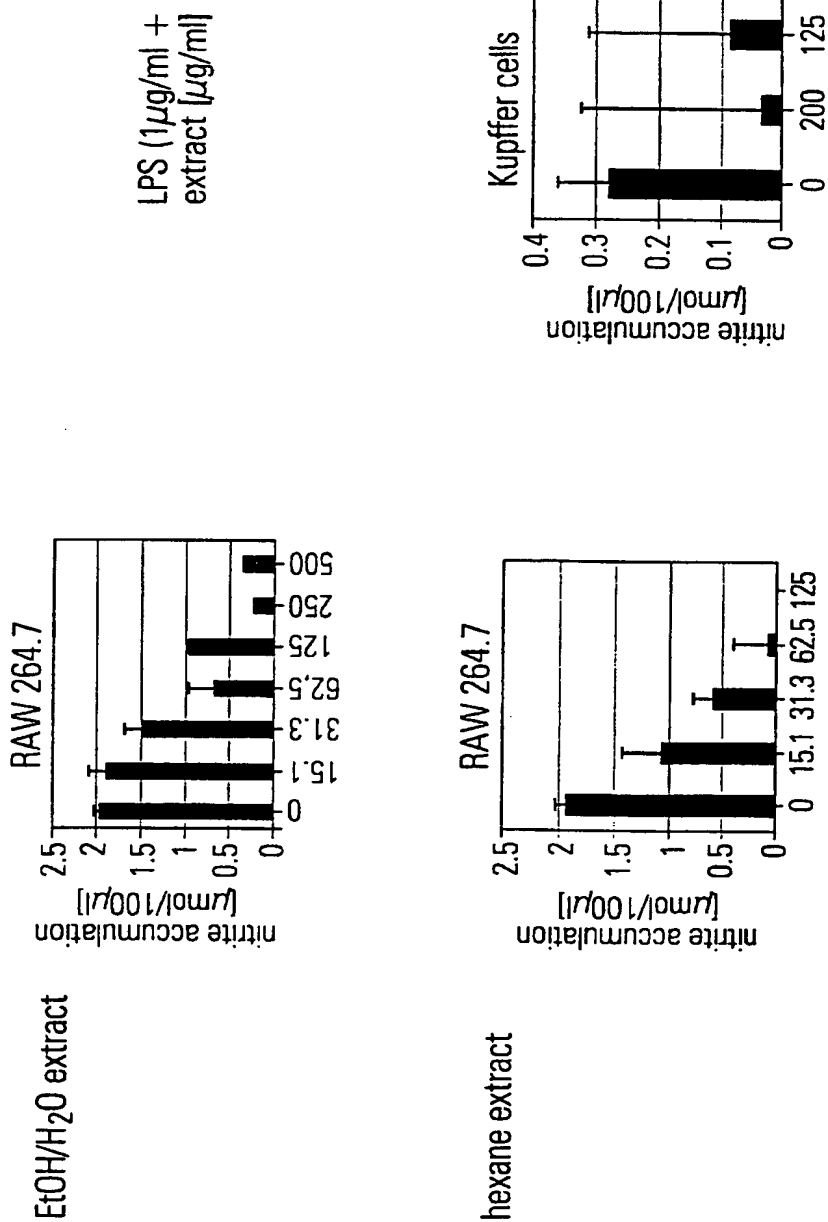
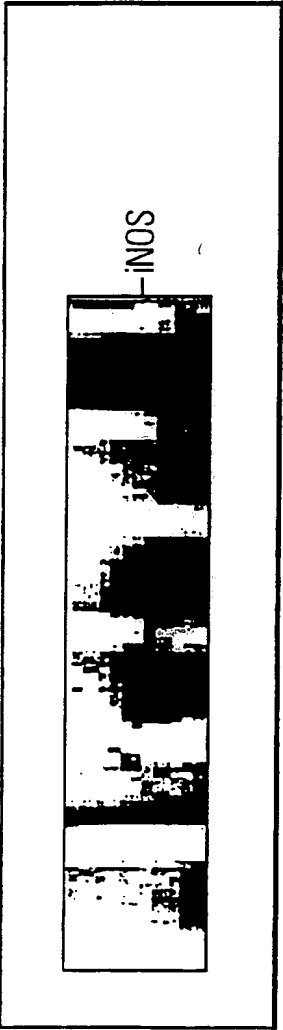


Abb.12

Phyllanthus amarus (EtOH/H₂O extract)
inhibits iNOS expression



-	0	-	500	+	0	+	250	+	125	+	62.5	+	MW LPS 1 μ g/ml
													P.a. EtOH/H ₂ O [μ g/ml]

13/14

Abb.13

Phyllanthus amarus (hexane extract)
inhibits expression of COX-2

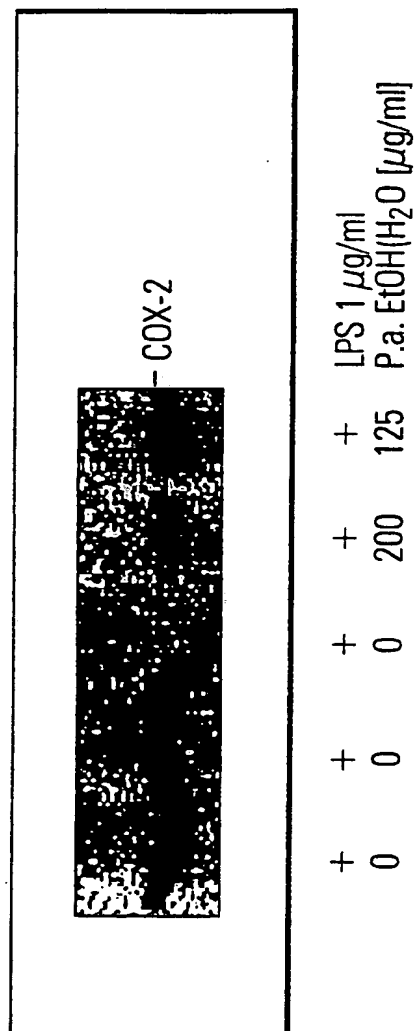
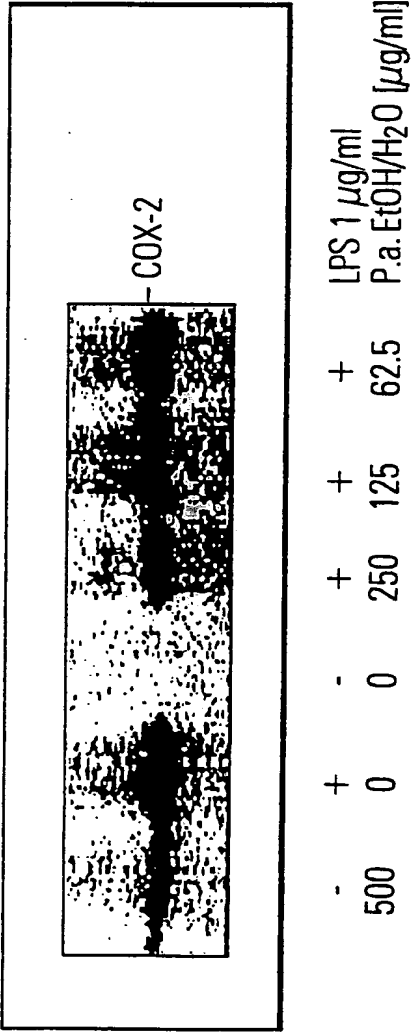


Abb.14

Phyllanthus amarus (EtOH/H₂O extract)
inhibits expression of COX-2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/03869

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, FSTA, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1997 ZHOU SHIWEN XU CHUANFU ET AL: "Mechanism of protective action of Phyllanthus urinaria L. against injuries of liver cells." Database accession no. PREV199799511060 XP002144251 abstract & ZHONGGUO ZHONGYAO ZAZHI, vol. 22, no. 2, 1997, pages 109-111, 129, ISSN: 1001-5302</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1,10-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 August 2000

Date of mailing of the international search report

17/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/03869

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1998 ASHA V V ET AL: "Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Phyllanthus kozhikodanus, P. maderaspatensis and Solanum indicum." Database accession no. PREV199800438007 XP002144252 abstract & FITOTERAPIA, vol. 69, no. 3, 1998, pages 255-259, ISSN: 0367-326X</p> <p>---</p>	1,10-18
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 6 February 1999 (1999-02-06) JEENA K JOSE ET AL: "Effect of Emblica officinalis, Phyllanthus amarus and Picrorrhiza kurroa on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis." Database accession no. PREV199900216982 XP002144253 abstract & CANCER LETTERS, vol. 136, no. 1, 6 February 1999 (1999-02-06), pages 11-16, ISSN: 0304-3835</p> <p>-----</p>	1,10-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In' itionales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03869

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K35/78

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, FSTA, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1997 ZHOU SHIWEN XU CHUANFU ET AL: "Mechanism of protective action of Phyllanthus urinaria L. against injuries of liver cells." Database accession no. PREV199799511060 XP002144251 Zusammenfassung & ZHONGGUO ZHONGYAO ZAZHI, Bd. 22, Nr. 2, 1997, Seiten 109-111, 129, ISSN: 1001-5302</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1,10-18

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. August 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Rempp, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intr. Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03869

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1998 ASHA V V ET AL: "Preliminary evaluation of the antihepatotoxic activity of Phyllanthus kozhikodanus, P. maderaspatensis and Solanum indicum." Database accession no. PREV199800438007 XP002144252 Zusammenfassung & FITOTERAPIA, Bd. 69, Nr. 3, 1998, Seiten 255-259, ISSN: 0367-326X</p> <p>---</p>	1,10-18
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 6. Februar 1999 (1999-02-06) JEENA K JOSE ET AL: "Effect of Emblica officinalis, Phyllanthus amarus and Picrorrhiza kurroa on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis." Database accession no. PREV199900216982 XP002144253 Zusammenfassung & CANCER LETTERS, Bd. 136, Nr. 1, 6. Februar 1999 (1999-02-06), Seiten 11-16, ISSN: 0304-3835</p> <p>-----</p>	1,10-18

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.